

POLIMORFISMA GEN RESEPTOR β_3 -ADRENERGIK,
GEN RESEPTOR LEPTIN, GEN RESEPTOR
GLUKOKORTIKOID DAN GEN FAKTOR
NEKROSIS TUMOR- α PADA PESAKIT
DIABETES MELITUS JENIS 2

SHARIFAH IZWAN BT. TUAN OTHMAN

UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

2006

**POLIMORFISMA GEN RESEPTOR β_3 -ADRENERGIK, GEN RESEPTOR
LEPTIN, GEN RESEPTOR GLUKOKORTIKOID DAN GEN
FAKTOR NEKROSIS TUMOR- α PADA PESAKIT
DIABETES MELITUS JENIS 2**

Oleh:

SHARIFAH IZWAN BT. TUAN OTHMAN

Tesis yang diserahkan untuk memenuhi keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains

Mei 2006

PENGAKUAN

Diperakukan bahawa tesis ini merupakan hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

.....

Sharifah Izwan Bt. Tuan Othman

Mei 2006

PENGHARGAAN

Dengan nama Allah Yang Maha Pemurah lagi Maha Penyayang

Segala puji bagi Allah di atas kurniaanNya dapatlah kajian ilmiah ini dapat disempurnakan. Setinggi-tinggi penghargaan yang tidak terhingga dan jutaan terima kasih diucapkan kepada Profesor Mohd. Nizam B. Isa (Pensyarah di Universiti Teknologi MARA) selaku penyelia utama di atas segala bantuan, bimbingan, tunjuk ajar, teguran dan dorongan secara berterusan daripada beliau yang amat berharga dalam memastikan kajian ini dapat dihasilkan dengan jayanya.

Jutaan terima kasih buat Prof. Madya Dr. Ab. Aziz Al-Safi B. Ismail (Ketua Jabatan di Jabatan Perubatan Masyarakat, USM) selaku penyelia bersama saya di atas segala tunjuk ajar dan bantuan yang berterusan serta kefahaman yang mendalam di sepanjang kajian ini dijalankan sehinggalah kepada proses penyemakan dan pembetulan tesis dijalankan.

Penghargaan yang tidak terhingga juga disampaikan buat Universiti Sains Malaysia di atas penganugerahan geran jangka pendek (304/PPSP/6131125) yang membolehkan kajian ini dijalankan dengan sempurna.

Penghargaan yang tidak terhingga diberikan kepada Prof. Dr. Rahim B. Md. Noah, Dekan Pusat Pengajian Industri Sains Perubatan, UNISEL yang banyak memberi kritikan membina terhadap penulisan tesis serta dorongan dan kemudahan semasa penyiapan tesis ini dijalankan. Setinggi-tinggi ucapan terima kasih dan penghargaan

ditujukan khas buat semua kakitangan Pusat Genom Manusia (PGM), Universiti Sains Malaysia terutamanya Encik Mohd. Ros Sidek (Pegawai Sains, PGM) dan Puan Siti Fatimah Ramli (Juru Teknologi Kanan, PGM) yang telah banyak membantu dari segi teknikal, pengurusan stok, nasihat dan bimbingan yang berterusan tanpa jemu sepanjang kajian penyelidikan ini dihasilkan. Setinggi ucapan terima kasih juga buat kakitangan Klinik Rawatan Keluarga yang banyak memberi kerjasama terutamanya dalam proses pengumpulan sampel dijalankan.

Ribuan terima kasih juga diucapkan kepada rakan-rakan seperjuangan terutama sekali Ja, Ina, Kak Khai, Abang Aziz, Kak Lia, Kak Wan, Kak Janah, Wan, Yana, Abang Ezlan, Jud dan Amir yang banyak membantu dan memberi dorongan tanpa jemu samada waktu susah atau senang semasa penyelidikan dan penulisan ini dijalankan. Terima kasih yang tidak terhingga kepada kakitangan sokongan PGM terutamanya Kak Yah, Azam dan Kak Zah yang banyak membantu melicinkan lagi proses penyelidikan ini dijalankan. Bantuan kalian amatlah dihargai. Seterusnya buat semua kakitangan USM yang terlibat. Khas buat suami tercinta dan keluarga yang tersayang yang banyak membantu dan berkorban sepanjang kajian ini dijalankan, dorongan dan semangat daripada kalian membolehkan hasil kajian ini berjaya dilakukan. Terima kasih buat semua.

SENARAI KANDUNGAN

Kandungan	Muka surat
TAJUK	i
AKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
SENARAI KANDUNGAN	v
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xiii
SENARAI GAMBARFOTO	xv
SENARAI SINGKATAN	xvi
SENARAI UNIT/SIMBOL	xvii
SENARAI LAMPIRAN	xviii
SENARAI PEMBENTANGAN KERTAS KERJA	xix
ABSTRAK	xxii
ABSTRACT	xiv
BAB 1 PENGENALAN	1
1.1 Tinjauan Perpustakaan	2
1.1.1 Diabetes Melitus	2
1.1.2 Diabetes Melitus Jenis 2 (DM2)	3
1.1.2 (a) Faktor genetik dalam DM2	9
1.1.2 (b) Faktor genetik dalam diabetes melitus lain	12
1.1.3 Gen yang terlibat dalam kajian	15
1.1.3 (a) Gen reseptor leptin	15
1.1.3 (b) Gen reseptor β_3 -adrenergik	21
1.1.3 (c) Gen reseptor glukokortikoid	24
1.1.3 (d) Gen faktor nekrosis tumor-alfa	27
1.1.4 Analisa polimorfisma gen-gen kajian	29
1.2 Objektif Kajian	32

1.2.1	Objektif khusus	32
BAB 2	BAHAN DAN KAEDAH	33
2.1	Persampelan	33
2.1.1	Persampelan	34
2.1.2	Pengambilan sampel	36
2.2	Bahan-bahan dan penyediaan reagen	36
2.2.1	Reagen-reagen yang digunakan dalam pengekstrakan DNA	36
2.2.1 (a)	Penimbal lisis sel darah merah	37
2.2.1 (b)	Penimbal Sodium Tris EDTA (STE)	37
2.2.1 (c)	Larutan 10% <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> (SDS)	37
2.2.1 (d)	Larutan 6M sodium klorida tepu (NaCl)	38
2.2.1 (e)	Larutan etanol 70%	38
2.2.1 (f)	Larutan Proteinase-K	38
2.2.1 (g)	Larutan penimbal Tris-EDTA (TE)	38
2.2.2	Reagen-reagen yang digunakan untuk tindakbalas rantai polimerase	39
2.2.2 (a)	Jujukan Primer	39
2.2.2 (b)	Pengesahan pemilihan jujukan pasangan primer	39
2.2.2 (c)	'Master Mix'	41
2.2.3	Polimorfisma Restriksi Panjang Fragmen (RFLP)	42
2.2.3 (a)	Pemilihan enzim restriksi	42
2.2.3 (b)	Pengesahan pemilihan enzim restriksi	42
2.2.3 (c)	Enzim restriksi yang digunakan	44
2.2.3 (c) (i)	Enzim MvaI	44
2.2.3 (c) (ii)	Enzim NcoI	46
2.2.3 (c) (iii)	Enzim Tsp509I	48
2.2.3 (d)	'Master Mix' sistem RFLP	50
2.2.4	Medium elektroforesis (Proses penyaringan)	50
2.2.4 (a)	Penyediaan larutan stok 10X TBE	50
2.2.4 (a) (i)	Penyediaan larutan 0.5M EDTA (ph 8.0)	50
2.2.4 (a) (ii)	Penyediaan larutan 10X penimbal TBE	51
2.2.4 (b)	Penyediaan larutan 1X penimbal TBE	51
2.2.4 (c)	Penyediaan gel bagi menilai hasil ekstrak DNA dan produk PCR	51
2.2.5	Penyediaan medium bagi analisa mutasi	52
2.2.5 (a)	Gel 3.5% agarosa (<i>pre-stain</i>) dan medium penimbal 1X TBE	53
2.2.5 (b)	Gel 4.0% agarosa dan medium penimbal 1X TBE	53
2.2.5 (c)	Gel 4.0% metafor dan medium penimbal 0.5X TBE	54
2.2.5 (c) (i)	Penyediaan larutan 0.5X penimbal TBE	54
2.2.5 (d)	Gel 12.5% poliakrilamida dan medium penimbal 1X TBE	55
2.2.5 (d) (i)	Penyediaan larutan 10.0% amonium persulfat	56
2.2.5 (d) (ii)	Larutan TEMED	56
2.2.6	6X penimbal pemuat sampel asid nukleik	56

2.2.7	Penanda saiz DNA	56
2.2.8	Bahan pewarna	57
2.2.8 (a)	Pewarna Ethidium bromida	57
2.2.8 (b)	Pewarnaan perak	57
2.2.8 (b) (i)	Larutan Fiksasi	57
2.2.8 (b) (ii)	Larutan <i>silver nitrate</i>	57
2.2.8 (b) (iii)	Larutan pembentuk (<i>Developer</i>)	58
2.2.8 (b) (iv)	Larutan penetap (<i>Stop Solution</i>)	58
2.2.9	Penulenan DNA	58
2.2.9 (a)	Kit Penulenan DNA	58
2.2.9 (b)	Gel agarosa 'titik pencairan rendah' (<i>low melting point</i>)	59
2.2.10	Senarai peralatan	59
2.2.10 (a)	Alat kitaran terma	59
2.2.10 (b)	Sistem elektroforesis gel secara mendatar	59
2.2.10 (c)	Sistem elektroforesis gel secara menegak	60
2.2.10 (d)	Peralatan lain	60
2.3	Kaedah kajian	61
2.3.1	Pengekstrakan DNA daripada darah periferi	61
2.3.2	Penentuan kepekatan dan ketulenan DNA	64
2.3.2 (a)	Kaedah kuantitatif	64
2.3.2 (b)	Kaedah kualitatif	65
2.3.3	Proses Tindak Balas Rantaian Polimerase (PCR)	66
2.3.3 (a)	Proses PCR	66
2.3.3 (b)	Penyaringan kualiti PCR	69
2.3.4	Polimorfisma restriksi panjang fragmen (RFLP)	70
2.3.4 (a)	Proses RFLP	70
2.3.5	Penyaringan mutasi melalui kaedah elektroforesis	72
2.3.5 (a)	Elektroforesis gel 3.5% agarosa dengan pewarna Ethidium bromida	72
2.3.5 (b)	Elektroforesis gel 4.0% agarosa tanpa pewarna Ethidium bromida	72
2.3.5 (c)	Elektroforesis gel 4.0% metafor dengan penimbal 0.5X TBE	73
2.3.5 (d)	Elektroforesis gel 12.5% poliakrilamida dengan pewarnaan perak	73
2.3.5 (d) (i)	Pemasangan acuan gel poliakrilamida	73
2.3.5 (d) (ii)	Pelarian elektroforesis gel 12.5% poliakrilamida	75
2.3.5 (d) (iii)	Pewarnaan gel poliakrilamida	76
2.3.5 (d) (iv)	Pemerhatian jalur pada gel poliakrilamida	77
2.3.6	Analisa penjujukan DNA	77
2.3.6 (a)	Penulenan DNA	77
2.3.6 (b)	Pemprosesan penjujukan DNA	79
2.4	Analisa statistik	79

3.1	Persampelan	81
3.2	Kajian makmal	83
3.2.1	Pengekstrakan DNA	83
3.2.2	Amplifikasi PCR	83
3.2.3	Analisa polimorfisma menggunakan kaedah RFLP	89
3.2.3 (a)	Polimorfisma Trp ⁶⁴ Arg pada gen β_3 -AR	89
3.2.3 (b)	Polimorfisma G ⁻³⁰⁸ A pada gen Tnf- α	91
3.2.3 (c)	Polimorfisma Asn ³⁶³ Ser pada gen GRL	91
3.2.4	Analisa polimorfisma menggunakan kaedah PCR-PAGE	94
3.3	Kekerapan genotip dan alel	98
3.3.1	Polimorfisma Trp ⁶⁴ Arg pada gen β_3 -AR	98
3.3.2	Polimorfisma penyelitan/delesi pentanukleotida pada 3'-UTR pada gen LEPR	100
3.3.3	Polimorfisma G ⁻³⁰⁸ A pada gen Tnf- α	102
3.3.4	Polimorfisma Asn ³⁶³ Ser pada gen GRL	104
3.3.5	Kerentanan gen	106
3.4	Corak taburan gen mutan dan gen jenis liar	108
3.4.1	Taburan gen mutan dan gen jenis liar pada sampel pesakit DM2 dan kawalan	108
3.4.2	Perbandingan corak taburan genotip mutasi di antara pesakit DM2 dan kawalan	111
3.5	Hubungan genotip dan fenotip bagi pesakit DM2 dan kawalan	118
3.5.1	Hubungan genotip dan fenotip dalam polimorfisma Trp ⁶⁴ Arg pada gen β_3 -AR	118
3.5.2	Hubungan genotip dan fenotip dalam polimorfisma penyelitan/delesi pentanukleotida pada 3'-UTR pada gen LEPR	121
3.5.3	Hubungan genotip dan fenotip dalam polimorfisma G ⁻³⁰⁸ A pada gen Tnf- α	123
3.5.4	Hubungan genotip dan fenotip dalam polimorfisma Asn ³⁶³ Ser pada gen GRL	125
3.5.5	Perbandingan ciri klinikal dalam subjek yang mempunyai jenis gen tertentu	128
3.5.5 (a)	Perbandingan ciri klinikal pada subjek kajian yang mempunyai gen mutan secara tunggal	128
3.5.5 (b)	Perbandingan ciri klinikal pada subjek kajian yang mempunyai mutasi kombinasi 2 gen	132
3.5.5 (c)	Perbandingan ciri klinikal pada subjek kajian yang mempunyai mutasi kombinasi 3 gen	136
3.5.5 (d)	Perbandingan ciri klinikal pada subjek kajian secara keseluruhan	136

BAB 4	PERBINCANGAN	139
4.1	Kekerapan dan peranan polimorfisma gen-gen kajian	141
4.1.1	Polimorfisma Trp ⁶⁴ Arg pada gen β_3 -AR	141
4.1.2	Polimorfisma delesi/penyisipan pentanukleotida pada 3'-UTR pada gen LEPR	145
4.1.3	Polimorfisma G ⁻³⁰⁸ A pada gen Tnf- α	148
4.1.4	Polimorfisma Asn ³⁶³ Ser pada gen GRL	150
4.2	Corak mutasi gen	153
4.2.1	Mutasi gen tunggal	153
4.2.2	Mutasi poligen	154
4.2.3	Limitasi kajian dan cadangan	156
BAB 5	KESIMPULAN	159
	RUJUKAN	161
	LAMPIRAN	
1.	Borang soal selidik subjek kajian	175
2.	Salinan penerbitan dan pembentangan abstrak	179

SENARAI JADUAL

Jadual	Muka surat
1.1 Sebahagian gen yang terlibat dalam perkembangan DM2 dan etiologi utama penyakit DM2.	11
1.2 Gen yang menyebabkan DM1 dan kesan mutasi terhadap populasi tertentu.	13
1.3 Jenis-jenis mutasi yang terdapat dalam gen LEPR	19
2.1 Jumlah sampel paling minima yang diperlukan bagi setiap gen kajian berdasarkan nilai peratusan populasi rujukan	35
2.2 Jujukan set primer yang digunakan berdasarkan gen-gen yang dikaji dan sumber rujukan setiap set primer.	40
2.3 Rujukan bagi setiap jujukan gen kajian serta saiz produk PCR yang dijangkakan didapati selepas proses PCR dilakukan	41
2.4 Enzim restriksi dan sistem penimbal yang digunakan dalam setiap kajian mutasi gen serta syarikat pengeluar reagen tersebut.	43
2.5 Jenis-jenis serta keadaan elektroforesis yang digunakan bagi memerhatikan mutasi yang terdapat pada gen-gen yang dikaji	52
2.6 Penyediaan gel 12.5% poliakrilamida yang digunakan dalam analisa mutasi gen reseptor Leptin	55
2.7 Kepekatan akhir reagen-reagen PCR dalam <i>master mix</i> .	67
2.8 Keadaan PCR yang digunakan bagi mengamplifikasi kawasan analisa bagi setiap gen kajian.	67

2.9	Jenis-jenis enzim restriksi dan keadaan pengeraman yang digunakan serta produk RFLP yang dihasilkan bagi setiap gen-gen yang dikaji	71
2.10	Komponen master mix yang disediakan bagi setiap proses RFLP setiap gen kajian	71
3.1	Taburan ciri-ciri klinikal bagi kedua-dua kumpulan subjek kajian.	82
3.2	Kekerapan genotip dan alel bagi gen β_3 -AR yang terdapat dalam sampel pesakit DM2 dan kawalan.	99
3.3	Kekerapan genotip dan alel bagi gen LEPR yang terdapat dalam sampel pesakit DM2 dan kawalan.	101
3.4	Kekerapan genotip dan alel bagi gen Tnf- α yang terdapat dalam sampel pesakit DM2 dan kawalan.	103
3.5	Kekerapan genotip dan alel bagi gen GRL yang terdapat dalam sampel pesakit DM2 dan kawalan.	105
3.6	Taburan genotip secara keseluruhan bagi gen β_3 -AR, LEPR, Tnf- α dan GRL yang terdapat pada sampel pesakit DM 2.	109
3.7	Taburan genotip bagi gen β_3 -AR, LEPR, Tnf- α dan GRL yang terdapat pada sampel kawalan.	110
3.8	Perbandingan ciri-ciri klinikal bagi kumpulan genotip yang berbeza pada gen β_3 -AR dalam pesakit DM2 dan kawalan	120
3.9	Perbandingan ciri-ciri klinikal bagi kumpulan genotip yang berbeza pada gen LEPR dalam pesakit DM2 dan kawalan	122
3.10	Perbandingan ciri-ciri klinikal bagi kumpulan genotip yang berbeza pada gen Tnf- α dalam pesakit DM2 dan kawalan	124
3.11	Perbandingan ciri-ciri klinikal bagi kumpulan genotip yang berbeza pada gen GRL dalam pesakit DM2 dan kawalan	127
3.12	Perbandingan ciri-ciri klinikal yang dipamerkan oleh pesakit DM 2 yang mempunyai gen β_3 -AR, LEPR, Tnf- α dan GRL yang mutan secara tunggal	130

3.13	Perbandingan ciri-ciri klinikal yang dipamerkan oleh kawalan yang mempunyai gen β_3 -AR, LEPR, Tnf- α dan GRL yang mutan secara tunggal	131
3.14	Perbandingan ciri-ciri klinikal yang dipamerkan oleh pesakit DM 2 yang mempunyai mutasi kombinasi 2 gen	134
3.15	Perbandingan ciri-ciri klinikal yang dipamerkan oleh kawalan yang mempunyai mutasi kombinasi 2 gen	135
3.16	Ciri-ciri klinikal pesakit dan kawalan mengikut pecahan gen jenis liar dan gen yang bermutasi	138

SENARAI RAJAH

Rajah		Muka surat
1.1	Kedudukan organ dan sistem yang mengalami kesan komplikasi DM2 yang kronik	8
1.2	Struktur kromosom 1 yang menunjukkan kedudukan gen LEPR pada kromosom 1p31	17
1.3	Struktur batang-gelung yang terbentuk akibat penyisipan GAAAU yang berkomplementari dengan CUUUA (ditandakan dengan bintang) dalam jujukan mRNA reseptor leptin	19
1.4	Struktur ekstrasel dan intrasel reseptor β_3 -adrenergik.	23
1.5	Struktur gen reseptor glukokortikoid	24
1.6	Struktur genomik bagi gen reseptor glukokortikoid yang menunjukkan kedudukan dan jenis polimorfisma yang dapat diperhatikan	26
1.7	Struktur gen faktor tumor nekrosis- α yang terletak dilokus 6p21.1-p21.3	28
1.8	Keseluruhan kajian analisa mutasi gen-gen bagi penyakit DM2	31
2.1	Formula Nisbah Tunggal yang digunakan bagi mendapatkan jumlah sampel yang digunakan dalam kajian	34
2.2	Jujukan pengenalan enzim MvaI dan tapak pemotongan MvaI	44
2.3	Struktur produk PCR bagi gen β_3 -AR yang menunjukkan tapak pemotongan enzim MvaI dan produk-produk RFLP mengikut jenis genotip dalam polimorfisma Trp ⁶⁴ Arg	45
2.4	Jujukan pengenalan oleh enzim NcoI dan tapak pemotongan NcoI	46

2.5	Struktur produk PCR bagi gen $Tnf-\alpha$ yang menunjukkan tapak pemotongan enzim $NcoI$ dan produk-produk RFLP mengikut genotip dalam polimorfisma $G^{308}A$	47
2.6	Jujukan pengenalan oleh enzim $Tsp509I$ dan tapak pemotongan $Tsp509I$	48
2.7	Struktur produk PCR bagi gen GRL yang menunjukkan tapak pemotongan enzim $Tsp509I$ dan produk-produk RFLP mengikut genotip dalam polimorfisma $Asn^{363}Ser$	49
2.8	Keadah pengestrakan DNA menggunakan tatacara Miuller <i>et al.</i> (1988)	62
2.9	Keadah penulenan DNA menggunakan kit penulenan <i>QIAquick Gel Extraction</i> (QIAGEN, Operon Inc., USA)	80
3.1	Perbandingan kekerapan alel bagi polimorfisma gen β_3 -AR, LEPR, GRL dan $Tnf-\alpha$ yang ditunjukkan oleh pesakit DM2 dan kawalan	107
3.2	Perbandingan pecahan bilangan sampel dan peratusan mutasi gen dan gen jenis liar yang dapat diperhatikan dalam kedua-dua kumpulan pesakit DM2 dan kawalan	112
3.3	Perbandingan peratusan subjek pesakit dan kawalan yang mempunyai polimorfisma hanya satu gen (gen tunggal) dan polimorfisma dua atau lebih gen (poligen) melibatkan keempat-empat gen kajian	113
3.4	Perbandingan pecahan bilangan sampel dan peratusan mutasi gen tunggal yang didapati dalam kedua-dua kumpulan pesakit DM2 dan kawalan	115
3.5	Perbandingan pecahan bilangan sampel dan peratusan mutasi poligen yang dapat diperhatikan dalam pesakit DM2 dan kawalan	117

SENARAI GAMBARFOTO

Gambarfoto		Muka surat
3.1	Analisa kualitatif yang menggunakan elektroforesis gel 2.0% agarosa yang dijalankan terhadap genomik DNA	84
3.2	Analisa elektroforesis gel 2.0% agarosa yang dilakukan untuk menyaring produk PCR bagi gen β_3 -AR	85
3.3	Analisa elektroforesis gel 2.0% agarosa yang dilakukan untuk menyaring produk PCR bagi gen GRL	86
3.4	Analisa elektroforesis gel 2% agarosa yang dilakukan untuk menyaring produk PCR bagi gen Tnf- α	87
3.5	Analisa elektroforesis gel 2% agarosa yang dilakukan untuk menyaring kewujudan produk PCR bagi gen LEPR	88
3.6	Gel menunjukkan hasil RFLP yang menggunakan enzim restriksi MvaI	90
3.7	Elektroforesis gel 4.0% agarosa yang dijalankan untuk menganalisa mutasi G ⁻³⁰⁸ A pada gen Tnf- α yang dijalankan pada 100V selama 2 jam	92
3.8	Gel menunjukkan hasil RFLP yang menggunakan enzim restriksi Tsp509I	93
3.9	Elektroforesis gel 12.5% poliakrilamida yang dijalankan untuk menganalisa polymorfisma penyisipan/delesi (I/D) pentanukleotida pada 3'-UTR pada gen LEPR	95
3.10	Keputusan <i>sequencing</i> yang menunjukkan jujukan penyisipan dalam sampel pesakit DM2 yang mempunyai genotip homozigus penyisipan (I/I).	96
3.11	Keputusan <i>sequencing</i> yang menunjukkan jujukan penyisipan dalam sampel pesakit DM2 yang mempunyai genotip heterozigus penyisipan (D/I).	96
3.12	Keputusan <i>sequencing</i> yang menunjukkan jujukan DNA tanpa penyisipan dalam sampel pesakit DM2 yang mempunyai genotip homozigus delesi (D/D).	97

SENARAI SINGKATAN

A	: Adenin
Asn	: Asparagin
MBI	: <i>Body Mass Index</i> (Indeks Jisim Tubuh)
C	: Sitosin
DM2	: Diabetes Mellitus Jenis 2
DNA	: Deoxy-ribonucleic acid
dNTP	: deoxyribonucleoside triphosphate
EDTA	: Ethylene diamine trichloroacetic acid
EtBr	: Ethidium bromide
G	: Guanin
GAA	: Asid asetik glasial
GRL	: Reseptor Glukokortikoid
HCl	: Asid hidroklorik
KCl	: Potasium klorida
Lep	: Leptin
LEPR	: Reseptor Leptin
MgCl ₂	: Magnesium klorida
mRNA	: RNA penghantar
NaCl	: Sodium klorida
OD	: Ketumpatan optikal
PAGE	: Elektroforesis Gel Poliakrilamida
PCR	: Tindakan berantai polimerase
PCR-PAGE	: Tindakan berantai polimerase - elektroforesis gel poliakrilamid
RFLP	: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Ser	: Serin
T	: Tiamin
TDD	: Tekanan darah diastol
TDS	: Tekanan darah sistol
Tnf- α	: Faktor nekrosis tumor-alfa
Trp	: Triptofan
β_3 -AR	: Reseptor β_3 -adrenergik

SENARAI UNIT DAN SIMBOL

bp	: pasangan bes
g	: gram
BMI	: Indeks Jisim Tubuh (<i>Body Mass Index</i>)
kb	: kilo bes
L	: liter
M	: Molar
mg	: miligram
ml	: mililiter
mM	: mili Molar
mmol	: mili Mol
mol	: Mol
MW	: berat molekul
ng	: nanogram
°C	: darjah Celcius
p	: aras keertian
rpm	: rotor per minit
TDD	: tekanan darah diastolik
TDS	: tekanan darah sistolik
U	: unit
Z	: saiz sampel
µg	: mikrogram
µl	: mikroliter
µM	: mikro Molar
µmol	: mikro Mol
ρM	: piko Molar

SENARAI LAMPIRAN

Jadual		Muka surat
1.1	Borang soal selidik kajian	175
1.2	Salinan penerbitan dan abstrak pembentangan	179

SENARAI PEMBENTANGAN KERTAS KERJA

Penerbitan:

- 1) M.N. Isa, **S.I.T. Othman**, A.A. Ismail, M.Mafauzy, M.R. Sidek, S.F. Ramli, N.A. Adam

Trp⁶⁴Arg Polymorphism of the β_3 -adrenergic Receptor Gene Is Not Associated with the Incidence of Diabetes Mellitus Type II in Kelantan Malay Subjects

Proceeding of Malaysian Science and Technology Congress 2001 (COSTAM) – m/s 369-373.

- 2) **S.I.T. Othman**, A.A. Ismail, M. Mafauzy, M.R. Sidek, S.F. Ramli, M.N. Isa
Preliminary Study of NcoI Polymorphism of the Tnf- α Gene in Type 2 Diabetes in Kelantan Malays.

Proceeding of 13th National Biotechnology Seminar 2001 – m/s 399-402.

Pembentangan kertas kerja lisan:

- 1) **Tajuk:** Trp⁶⁴Arg Polymorphism of the β_3 -adrenergic Receptor Gene Is Not associated with the Incidence of Diabetes Mellitus Type II in Kelantan Malay Subjects

Penulis: M.N. Isa , **S.I.T. Othman**, A.A. Ismail, M.Mafauzy, M.R. Sidek, S.F. Ramli, N.A. Adam

Tempat: Malaysian Science and Technology Congress 2001, Kota Kinabalu, Sabah

Tarikh: 23-26 September 2001

2) Tajuk: Preliminary Study of NcoI Polymorphism of the Tnf- α Gene in Type 2 Diabetes in Kelantan Malays

Penulis: **S.I.T. Othman**, A.A. Ismail, M. Mafauzy, M.R. Sidek, S.F. Ramli, M.N. Isa

Tempat: 13th National Biotechnology Seminar 2001, Pulau Pinang

Tarikh: 10-13 November 2001

3) Tajuk: Analysis of Pentanucleotide Polymorphism of the 3'-UTR of the Leptin Receptor Gene with the Incidence of Type 2 Diabetes in Kelantan Malays

Penulis: **S.I.T. Othman**, A.A. Ismail, M. Mafauzy, M.R. Sidek, S.F. Ramli, M.N. Isa

Tempat: 17th National Conference on Medical Sciences 2002, Kota Bharu, Kelantan

Tarikh: 17 & 18 Mei 2002

Pembentangan kertas kerja poster:

1) Tajuk: Analysis of Trp⁶⁴Arg Polymorphism of the β_3 -adrenergic Receptor Gene in Diabetes Mellitus type II in Kelantan Malay subject.

Penulis: **S.I.T. Othman**, A.A. Ismail, M. Mafauzy, M.R. Sidek, S.F. Ramli, M.N. Isa

Tempat: First Asean Conference On Medical Sciences, Kota Bharu, Kelantan

Tarikh: 18-21 Mei 2001

2) Tajuk: Modified method for pentanucleotide insertion/deletion polymorphism of the 3'-UTR of the LEPR gene analysis

Penulis: **S.I.T. Othman₂**, A.A. Ismail, M.R. Sidek, S.F. Ramli, M.N. Isa

Tempat: 27th Annual Conference of the MSBMB 2002, Pan Pacific Hotel, Kuala Lumpur

Tarikh: 7 November 2002

3) Tajuk: The pattern of mutant genotype in type 2 Diabetes in Kelantan Malays

Penulis: **S.I.T. Othman₂**, A.A. Ismail, M.R. Sidek, S.F. Ramli, M.N. Isa

Tempat: 4th HUGO Pacific Meeting & 5th Asia-Pacific Conference on Human Genetics, Ambassador City Jomtien, Pattaya, Colburi, Thailand

Tarikh: 27-30 Oktober 2002

**POLIMORFISMA GEN RESEPTOR β_3 -ADRENERGIK, GEN RESEPTOR
LEPTIN, GEN RESEPTOR GLUKOKORTIKOID DAN FAKTOR
NEKROSIS TUMOR- α DALAM PESAKIT
DIABETES MELITUS JENIS 2**

ABSTRAK

Diabetes Melitus Jenis 2 (DM2) merupakan penyakit kompleks yang amat kerap berlaku akibat perubahan corak pemakanan dan gaya hidup manusia. Etiologi DM2 melibatkan pengaruh mutasi gen yang menyebabkan gangguan metabolisme glukosa dan lipid, kerintangan insulin, obesiti atau kekurangan sekresi insulin. Namun terdapat perbezaan mutasi gen yang ketara di antara populasi yang berbeza asal keturunan dan kedudukan geografi. Kajian yang dilakukan terhadap gen β_3 -AR, LEPR, Tnf- α dan GRL ini adalah untuk mengenalpasti insiden serta corak polimorfisma gen-gen dalam pesakit DM2 di kalangan etnik Melayu yang mendapatkan rawatan di Klinik Rawatan Keluarga, HUSM, Kelantan. Seramai 116 orang pesakit DM2 dan 84 orang kawalan terlibat dalam kajian ini. Kaedah PCR-RFLP digunakan untuk analisa mutasi silap terjemah pada polimorfisma Trp⁶⁴Arg bagi gen β_3 -AR, G⁻³⁰⁸A bagi gen Tnf- α dan Asn³⁶³Ser bagi gen GRL. Manakala bagi polimorfisma penyelitan/delesi pada 3'-UTR pada gen LEPR, dianalisa menggunakan kaedah PCR-PAGE. Sampel DNA dihantar untuk penjujukan DNA bagi mengesahkan jujukan penyelitan. Didapati pesakit DM2 menunjukkan tidak menunjukkan perbezaan kekerapan yang signifikan berbanding kawalan dalam polimorfisma Trp⁶⁴Arg, penyelitan/delesi 3'-UTR, G⁻³⁰⁸A dan Asn³⁶³Ser dengan nilai 0.099, 0.164, 0.026 dan 0.047 berbanding 0.098, 0.131, 0.071 dan 0.036 masing-masing ($p = 0.646, 0.701, 0.090$ dan 0.656). Secara keseluruhannya,

polimorfisma gen yang paling utama dalam pesakit DM2 adalah LEPR (16.4%), diikuti dengan β_3 -AR (9.9%), GRL (4.7%) dan Tnf- α (2.6%). Bagi subjek kawalan pula, corak yang sama telah ditunjukkan bagi gen LEPR (13.3%) dan β_3 -AR (9.8%), namun polimorfisma gen Tnf- α didapati lebih tinggi berbanding gen GRL (7.1% dan 3.6% masing-masing). Kebanyakan sampel pesakit dan kawalan yang bermutasi (59.0% dan 90.0% masing-masing) mempunyai hanya satu mutasi gen, diikuti dengan kombinasi mutasi 2-gen dengan 20.7% daripada pesakit DM2 dan 10.0% daripada kawalan. Kombinasi mutasi gen yang paling kerap berlaku di kalangan pesakit DM2 adalah LEPR dan β_3 -AR serta LEPR dan GRL manakala kombinasi LEPR dan GRL serta β_3 -AR dan GRL adalah bagi subjek kawalan. Kombinasi mutasi 3-gen didapati hanya terdapat pada seorang pesakit DM2 (1.7%) dan tiada seorang subjek kajian mempunyai mutasi keempat-empat gen. Didapati pesakit DM2 menunjukkan hubungan yang signifikan di antara genotip mutasi bagi semua gen kajian dengan faktor jantina dan sejarah keluarga. Pesakit juga mempamerkan kesan genotip heterozigus Trp⁶⁴Arg terhadap peningkatan min umur, BMI dan TDS, heterozigus G⁻³⁰⁸A dengan tempoh menghidap DM2 yang lama serta heterozigus Asn³⁶³Ser dengan obesiti apabila dibandingkan dengan kawalan yang mempunyai genotip heterozigus mutan. Secara kesimpulannya didapati polimorfisma Trp⁶⁴Arg bagi gen β_3 -AR, penyelitan/delesi pada 3'-UTR bagi gen LEPR, G⁻³⁰⁸A bagi gen Tnf- α dan Asn³⁶³Ser bagi gen GRL tidak memainkan peranan secara langsung dalam perkembangan penyakit DM2 jika bertindak secara bersendirian. Namun polimorfisma tersebut mungkin terlibat dalam patogenesis DM2 jika bertindak secara sinergi dengan beberapa gen yang lain.

Kata kunci: Polimorfisma Trp⁶⁴Arg pada gen β_3 -AR, polimorfisma penyelitan/delesi pada 3'-UTR pada gen LEPR, polimorfisma G⁻³⁰⁸A pada gen Tnf- α , polimorfisma Asn³⁶³Ser pada gen GRL, RFLP dan PAGE.

**POLYMORPHISM OF β_3 -ADRENERGIC RECEPTOR, LEPTIN RECEPTOR,
GLUCOCORTICOID RECEPTOR AND TUMOUR NECROSIS FACTOR- α
GENE AMONG PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS**

ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2D) is a common complex disorder that develops from changing of human nutrition and life styles. The etiology of T2D includes genetic mutations that disturb lipid and glucose metabolism, insulin resistance, obesity and deficiency in insulin secretion. However, major differences of genes mutations occur among various populations with different origin and geographical backgrounds. This study was performed to determine the incidence and pattern of β_3 -AR, LEPR, Tnf- α and GRL gene polymorphisms in T2D Malay patients attending Klinik Rawatan Keluarga, HUSM, Kelantan. A total number of 116 T2D patients and 84 normal healthy controls were involved in this study. Mutation analysis using PCR-RFLP procedures were used to study missense mutation in the polymorphism of Trp⁶⁴Arg of the β_3 -AR, G⁻³⁰⁸A of the Tnf- α and Asn³⁶³Ser of the GRL genes polymorphisms. PCR-PAGE was used to analyze the insertion/deletion polymorphism of 3'-UTR of the LEPR gene. Then, DNA sequencing was carried out to confirm the insertion sequence. The results showed no significant different of genotype frequencies in the polymorphisms of Trp⁶⁴Arg, insertion/deletion of 3'-UTR, G⁻³⁰⁸A and Asn³⁶³Ser occurred between T2D patients and controls, with 0.099, 0.164, 0.026 and 0.047 compared to 0.098, 0.131, 0.071 and 0.036 respectively ($p = 0.646, 0.701, 0.090$ and 0.656). LEPR gene was the most common polymorphism appearing in T2D patients (16.4%), followed by β_3 -AR gene (9.9%), GRL gene (4.7%) and Tnf- α gene (2.6%). The controls showed almost similar pattern for the LEPR gene (13.3%) and β_3 -AR gene (9.8%), but Tnf- α gene polymorphism was

found to be higher than GRL (Tnf- α gene, 7.1% and GRL gene, 3.6%). Most of the T2D patients and controls that have the mutation alleles (59.0% and controls 90.0% respectively) have single gene mutation, followed by the combination of 2-genes mutation in 20.7% of patients and 10.0% of controls. The most common combinations are polymorphism of LEPR and GRL gene and also β_3 -AR and GRL gene in T2D patients. Whereas the combination of LEPR and GRL gene and also β_3 -AR and GRL gene in control subjects. Only one patient had the combination of 3-gene mutations and none of the studied samples had all 4-gene mutations. Patients showed significant association between all mutant genotypes studied with gender and positive family history. Patients also revealed the contribution of heterozygous Trp⁶⁴Arg with higher min age, BMI and SBP, G⁻³⁰⁸A with longer duration of diabetes, and heterozygous Asn³⁶³Ser with obesity as compared to controls. In conclusion, the analysis of the polymorphism of Trp⁶⁴Arg of the β_3 -AR gene, insertion/deletion of 3'-UTR of the LEPR gene, G⁻³⁰⁸A of the Tnf- α gene and Asn³⁶³Ser of GRL gene suggest that these polymorphisms do not directly contribute to the development of T2D when functioning individually in these subjects. However, they may contribute to the pathogenesis of T2D when function synergistically with several other genes.

Keywords: Trp⁶⁴Arg of the β_3 -AR gene polymorphism, insertion/deletion of 3'-UTR of the LEPR gene polymorphism, G⁻³⁰⁸A of the Tnf- α gene polymorphism, Asn³⁶³Ser of GRL gene polymorphism, RFLP and PAGE.

BAB 1

PENGENALAN

Diabetes Melitus jenis 2 (DM2) merupakan penyakit gangguan metabolik yang amat kerap berlaku di seluruh dunia. Menurut Bennet (2000), DM2 merupakan penyakit kegagalan metabolik yang paling utama di negara industri. Penyakit ini juga merupakan antara pembunuh paling utama terutamanya di negara-negara membangun. Penurunan produktiviti penduduk boleh disebabkan oleh gangguan kesihatan pesakit, serta hilang upaya yang disebabkan oleh amputasi, penyakit jantung, kegagalan renal dan kebutaan berpunca daripada komplikasi penyakit DM2 (Ramachandran, *et al.* 2002). Negara terpaksa memperuntukkan sejumlah besar wang bagi menangani epidemik diabetes dan menanggung rawatan yang ditanggung oleh pesakit (Gadsby, 2002). Kajian genetik terhadap penyakit DM2 telah dilakukan dengan begitu pesat di seluruh dunia termasuk di Jepun (Azuma, *et al.* 1998), Itali (Romeo, *et al.* 2001), Finland (Rissanen, *et al.* 1997), Perancis (Herrmann, *et al.* 1998) dan Pima Indians (Walston, *et al.* 1995). Namun oleh kerana variasi profil genetik yang diekspresi di antara populasi adalah begitu nyata, amatlah penting kajian genetik terhadap pesakit DM2 tempatan dilakukan

bagi membolehkan kita dapat lebih memahami patogenesis DM2, respon terhadap pelbagai rawatan yang berbeza serta risiko perkembangan komplikasi DM2 di kalangan pesakit setempat.

1.1 Tinjauan Perpustakaan

1.1.1 Diabetes Melitus

Sehingga tahun 2000, dilaporkan terdapat 154 juta pesakit DM2 di seluruh dunia (Zimmet, 2000). Dijangkakan, daripada jumlah tersebut seramai 33.0% penduduk gagal didiagnos dengan diabetes akibat sifatnya yang tanpa simptom serta perkembangannya yang mengambil masa yang begitu lama (Adams, 2000). Amos dan rakan-rakan (1997) menganggarkan seramai 221 juta pesakit menjelang tahun 2010 dengan jumlah paling ramai didapati di benua Afrika dan Asia manakala King *et al.*, (1998) telah menganggarkan sehingga tahun 2025, terdapat 300 juta penduduk dunia menghidap diabetes. Peningkatan jumlah sebanyak 150.0% ini dimonopoli pesakit dalam kumpulan umur 45 hingga 65 tahun serta penduduk bandar.

Wild dan rakan-akan (2004) melaporkan jumlah pesakit diabetes pada tahun 2000 adalah 171 juta dan sehingga tahun 2030 jumlahnya menjadi 366 juta orang. Negara yang paling tinggi peningkatan jumlah pesakit adalah India, *Middle Eastern Crescent*, dan Afrika sub-Sahara, manakala negara yang paling tinggi jumlah pesakit diabetes adalah India, diikuti oleh China, Amerika Syarikat dan Indonesia (King *et al.*, 1998).

1.1.2 Diabetes Melitus Jenis 2 (DM2)

DM2 merupakan penyakit kompleks yang terdiri daripada interaksi pelbagai mutasi gen dengan faktor persekitaran, penuaan dan gaya hidup seseorang (Turner *et al.*, 1995). DM2 mempunyai pengaruh genetik yang lebih kuat berbanding dalam DM1. Walaupun gen yang rentan terhadap DM2 telah dapat dikenalpasti, namun gen-gen yang terlibat dalam patogenesis DM2 serta cara pewarisannya masih tidak dapat ditentukan lagi (Elbin *et al.*, 1994). Pesakit juga didapati sering mempunyai sekurang-kurangnya dua daripada simptom yang dikenali sebagai sindrom metabolik (Zimmet, 1999). Sindrom metabolik terdiri daripada tekanan darah tinggi, *glucose intolerance*, hiperinsulinemia, peningkatan aras trigliserid, penurunan kolesterol HDL serta obesiti dan obesiti berpusat.

Pada tahun 1998, suatu kriteria baru bagi diagnosis DM2 telah dikeluarkan oleh WHO yang mana individu menunjukkan simptom diabetes serta mempunyai ujian glukos plasma ketika berpuasa (FBS) pada aras lebih daripada 7.0mmol/L atau *random blood sugar* (RBS) dicatatkan pada aras lebih daripada 11.1 mmol/L dengan sekali ujian sahaja. Pesakit juga boleh didiagnos dengan DM2 jika tidak menunjukkan simptom, namun menunjukkan aras glukos plasma ketika berpuasa lebih daripada 7.0mmol/L pada dua kali ujian (Alberti & Zimmet, 1998). Kriteria baru ini dikeluarkan berdasarkan kajian yang dilakukan menunjukkan bahawa pesakit yang didiagnos aras FBS pada 7.8 mmol/L mempunyai perkembangan terhadap komplikasi diabetes lebih cepat berbanding pesakit yang didiagnos dengan aras FBS yang lebih rendah (Colman *et al.* 1999).

DM2 biasanya dihadapi oleh pesakit dewasa yang kebanyakannya berumur 40-60 tahun (Lim, 2001), mengalami kerintangan insulin (Bennett, 2000) dan obes (DeFronzo & Ferrannini, 1991). Namun berlaku peningkatan insiden penyakit ini di kalangan kanak-kanak dengan 8.45% telah dilaporkan pada tahun 1998 (Fagot-Campagna 2000). Penyakit ini amat berkaitan dengan proses urbanisasi sesuatu penempatan serta pengambilan diet tinggi lemak dan glukosa, kurang bersenam dan cara hidup yang lebih sedentari (Zimmet, 2000). Dengan adanya pelbagai kemudahan bagi membantu aktiviti seharian, manusia zaman moden kurang melakukan pergerakan dan menggunakan tenaga berbanding manusia pada zaman terdahulu.

Faktor ini telah dibuktikan oleh populasi Pima Indians, yang merupakan puak orang asli di Arizona, Amerika. Puak ini dahulunya bergantung hidup pada aktiviti pertanian sebelum bertukar kepada cara hidup yang lebih moden akibat proses perindustrian. Populasi ini mempunyai prevalens DM2 yang tertinggi di dunia (Knowler *et al.*, 1990). Didapati bahawa populasi ini mempunyai mutasi gen pada kromosom 20 yang bertindak menurunkan aras penggunaan tenaga basal yang membolehkan tubuh mereka menyimpan kandungan lemak ketika keadaan kekurangan sumber makanan. Namun akibat perubahan gaya hidup ke arah pertambahan pengambilan makanan tinggi kalori serta kurang penggunaan tenaga, menyebabkan mutasi gen yang sepatutnya berfungsi menyelamatkan mereka ketika kekurangan makanan, bertindak meningkatkan insiden obesiti dan akhirnya meningkat insiden DM2 dengan amat drastik.

Prevalens penyakit DM2 di kalangan etnik berbeza yang tinggal di suatu tempat yang sama adalah berbeza dengan nyata yang mana etnik yang bermigran didapati mempunyai prevalens DM2 lebih tinggi berbanding etnik yang berasal daripada tempat

tersebut (Cokram, 2000). Ini disebabkan oleh proses adaptasi yang terpaksa dilakukan oleh populasi tersebut mengikut perubahan persekitaran. Mengikut Hong (2004), etnik yang berlainan menunjukkan perbezaan peratusan yang nyata terhadap obesiti, kawalan diabetes, sejarah keluarga yang positif serta jenis komplikasi yang berlaku pada pesakit diabetes. Ini disebabkan oleh setiap individu dalam populasi yang sama serta individu dalam populasi yang berlainan, mempunyai jujukan genom yang berbeza. Perbezaan ini berlaku akibat profil *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) yang berbeza yang memberikan identiti unik kepada seseorang individu dan populasi tertentu.

Peningkatan prevalens DM2 di Malaysia adalah seiring dengan Singapura, Thailand dan Indonesia (Cockram, 2000). Prevalens penyakit DM2 di Malaysia didapati meningkat dengan pantas dalam masa 20-30 tahun ini. Pada tahun 1960, dilaporkan prevalen DM2 adalah 0.16% (Pillay & Lim, 1960), meningkat kepada 1.6% pada tahun 1982 (Balasundram, 1982), 4.0% pada tahun 1984 dengan 60.0% daripadanya adalah kes yang baru didiagnos (Osman & Rampal, 1989), 6.3% pada tahun 1986 (Kementerian Kesihatan Malaysia, 1986), 14.6% pada tahun 1993 (Ali *et al.* 1993), 8.3% pada tahun 1996 (Bakri, 1996), 10.5% pada 1999 (Mafauzy *et al.*, 1999) dan 15.1% pada tahun 2000 (Lim, 2001).

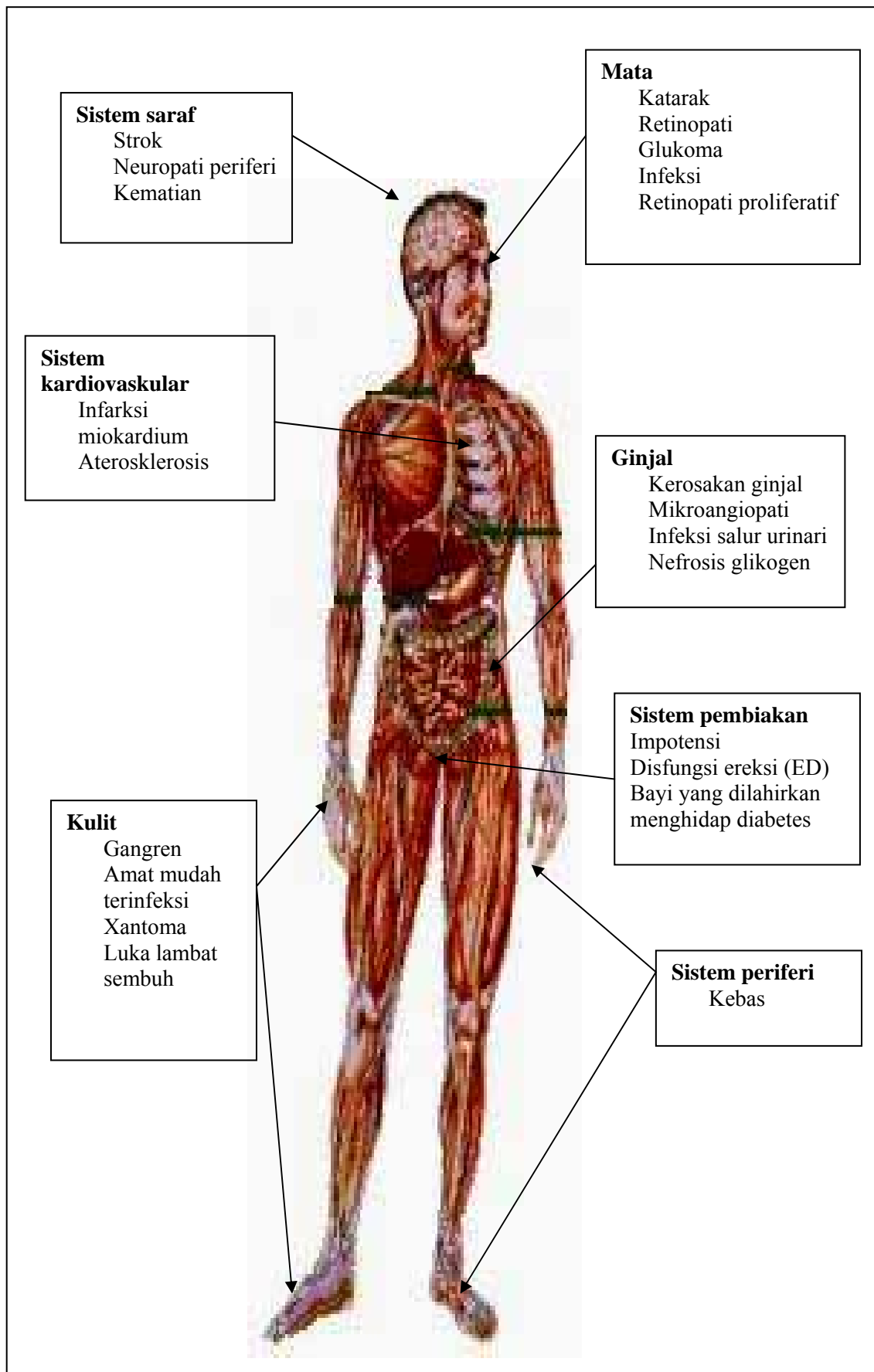
Mengikut Bakri (1996), sepertiga daripada 4.3% individu yang mempunyai '*impaired glucose tolerance, (IGT)*' dijangkakan akan menjadi pesakit DM2 dalam 5 hingga 10 tahun daripada *onset*. Didapati kaum India mempunyai peratusan tertinggi bagi penyakit DM2 dengan 14.3%, Cina dengan 7.1%, Melayu dengan 6.4% dan etnik peribumi dengan 3.5% (Lim, 2001). Ini bertepatan dengan pemerhatian yang menunjukkan

masyarakat yang paling hampir kepada cara hidup tradisional mempunyai risiko DM2 yang paling rendah (Ali & Rampal, 1993).

Menurut laporan yang ditulis oleh Bakri (1996) dalam laporan Tinjauan Kesihatan & Morbiditi Negara (ke-2), ciri-ciri demografi pesakit diabetes di Malaysia menunjukkan 70.0% daripada pesakit Melayu dan India adalah obes (Mustafa 1980). Lelaki dan wanita menghidap diabetes pada kadar yang sama (Balasundram, 1982). Negeri yang mempunyai pesakit diabetes yang paling tinggi adalah Selangor, diikuti dengan Pulau Pinang. Manakala jumlah kes yang tidak didiagnos tertinggi ditunjukkan oleh Negeri Sembilan, Pulau Pinang dan Melaka. Kes IGT yang tertinggi pula adalah di negeri Johor, Kuala Lumpur dan Melaka. Negeri Kelantan pula dilaporkan sebagai negeri yang mempunyai paling ramai pesakit yang dirawat menggunakan kaedah kawalan diet yang merupakan tahap pertama dalam rawatan DM2 (Bakri, 1996).

Tahap pendidikan seseorang juga didapati memainkan peranan yang mana semakin tinggi tahap pendidikan seseorang, semakin rendah prevalens DM2 dicatatkan. Ini mungkin berkaitan dengan kesedaran kesihatan dan sikap menjaga kesihatan yang lebih baik serta taraf sosioekonomi yang lebih baik yang membolehkan individu ini mengambil langkah untuk memperbaiki kualiti kesihatan mereka. Peratusan obesiti yang tertinggi dilaporkan oleh kaum India, diikuti oleh kaum Melayu, Cina dan kaum asli (Lim *et al.*, 2000). Penduduk bandar mempunyai prevalens yang lebih tinggi berbanding penduduk di kawasan pedalaman. Komplikasi yang paling kerap berlaku di kalangan pesakit diabetes Malaysia adalah retinopati (50.6%) dan kebas (38.5%) dan 10.0% lagi merangkumi angin ahmar, penyakit kardiovaskular dan lambat sembuh daripada luka (Bakri, 1996).

Komplikasi diabetes sering memberi kesan mortaliti dan morbiditi kepada pesakit serta meningkatkan kadar kematian dan kecacatan di sesebuah negara. Di antara komplikasi yang sering berlaku adalah hipertensi, kegagalan renal, penyakit jantung iskemia, retinopati, neuropati, ulser kaki yang boleh menyebabkan amputasi, infaksi miokardia dan impotensi (Leung & Lam, 2000) serta strok (Hamidon & Raymond, 2003). Mengikut Zaini (2000), komplikasi diabetes merupakan faktor utama berlakunya kematian awal, namun komplikasi boleh dielakkan dengan menetapkan dan mengawal aras glukos, tahap tekanan darah, aras lipid pada tahap normal serta mengekalkan berat badan yang unggul. Rajah 1.1 menunjukkan komplikasi yang sering berlaku pada pesakit DM2 mengikut organ-organ penting tubuh.



Rajah 1.1 Kedudukan organ dan sistem yang mengalami kesan komplikasi DM2 yang kronik. Adaptasi daripada Mohamad & Osman (1998)

1.2.2 (a) **Faktor genetik dalam DM2**

DM2 adalah kecacatan metabolik yang kronik dan kecacatan heterogenus secara genetiknya (Elbin, *et al.*, 1994). Sebahagian besar pesakit DM2 yang tipikal mempunyai corak mutasi gen yang tidak mematuhi hukum Mendel, mempunyai sindrom klinikal yang heterogenus (walaupun di kalangan ahli keluarga yang sama) serta mempunyai pengaruh persekitaran yang kuat (Silver & Shuldiner, 2000). Terdapat beberapa gen yang disyaki terlibat dalam perkembangan DM2 disebabkan oleh fungsinya dalam pelbagai tapak jalan metabolisme tubuh (Tuch *et al.*, 2000). Gen yang rentan ini terlibat samada dalam kerosakan sel β pankreas (LeRoith, 2002), kawalan pengambilan insulin pada tisu-tisu tubuh (Flier, 2001), penggunaan tenaga (Silver & Shuldiner, 2000), penghasilan obesiti (Seufert, 2004) dan kerintangan insulin (Hotamisligil, 1994) serta corak pengawalan kemandirian (Clement *et al.*, 1998) dan selera makan manusia (Blundell, 1999).

Terdapat pelbagai kajian yang dilakukan untuk menunjukkan bahawa terdapat faktor genetik dalam patogenesis DM2. Di antara kajian yang dilakukan adalah kajian kembar, kajian keluarga, kajian populasi, kajian kerentanan yang menggunakan penanda genetik dan pertalian ikatan genetik (Groop, 2000). Manakala kajian genetik yang membuktikan faktor genetik bagi penyakit DM2 adalah kajian kembar. Didapati pasangan kembar seiras mempunyai kadar keseragaman (*concordance rate*) yang jauh lebih tinggi berbanding kembar tak seiras, adik-beradik dan hubungan keluarga tahap pertama (Li *et al.*, 2004).

Terdapat dua cara untuk mengenalpasti gen yang terlibat dalam perkembangan sesuatu penyakit iaitu pengklonan penempatan dan pencalonan gen (Collins, 1992). Pengklonan penempatan atau analisa pertalian (*linkage analysis*) adalah suatu kaedah yang amat berkesan untuk menyaring gen yang terlibat dalam penyakit monogen. Namun bagi penyakit poligen seperti DM2, kaedah ini adalah sukar dan tidak sesuai digunakan kerana mutasi gen dalam penyakit kompleks ini berlaku secara heterogenus (Shuldiner & Silver, 2000). Maka kaedah yang lebih sesuai adalah kaedah pencalonan gen yang mana gen yang dijangka adalah berdasarkan tapak jalan protein yang terlibat dalam penghasilan penyakit ini (Makzewska-Malec *et al.* 2004). Terdapat pelbagai gen telah dilaporkan terlibat dalam perkembangan DM2 di seluruh dunia. Jadual 1.1 menunjukkan sebahagian mutasi gen yang terlibat dalam DM2 dan etiologi utama penyakit DM2 yang disebabkan oleh mutasi gen tersebut.

Jadual 1.1 Sebahagian gen yang terlibat dalam perkembangan penyakit DM2.

Mutasi gen	Kesan mutasi
Insulin (INS)	Menyebabkan DM2 secara sederhana & kerintangan insulin
Reseptor insulin (INSR)	Hiperglisemia & kerintangan insulin
Reseptor insulin substrat – 1 (IRS-1)	Kerintangan insulin
Faktor Transkripsi (HNF4A)	Aras glukosa berpuasa yang lebih tinggi
Reseptor Sulfonilurea (ABCC8)	Polimorfisma E1506K: menyebabkan hiperinsulineamia kongenital & gangguan sekresi insulin dalam pesakit DM2
Reseptor glukagon (GCGR)	Mutasi Gly ⁴⁰ Ser yang menyebabkan DM2 dalam populasi Finland
Glukokinase (GCK)	Polimorfisma Val ⁴⁵⁵ Met: menyebabkan ransangan sekresi insulin secara berlebihan
Glikogen sintase	Kerintangan insulin
Enzim Lipase Lipoprotein (LPL)	Menyebabkan DM2, obesiti abdomen, aras trigliserid yang tinggi, aras HDL kolesterol yang rendah & penyakit kardiovaskular
Pengangkut glukosa (GLUT-2)	Mengganggu regulasi glukosa
Peroxisome Proliferator-activated receptor- γ (PPRA- γ)	Obes secara morbid, penurunan sensitiviti terhadap thiazolidinediones
Leptin (Ob)	Obes secara morbid, kelewatan proses kematangan, penurunan termogenesis, rencatan aktiviti neuropeptid-Y, peningkatan selera makan.
Reseptor leptin (LEPR)	obesiti secara morbid, hiperinsulinemia, <i>onset</i> DM2 yang lebih awal, hipogonadism
Reseptor β_3 -adrenergik (β_3 -AR)	obesiti secara morbid, <i>onset</i> DM2 yang lebih cepat, susah menurunkan berat badan, aras metabolisme basal yang rendah
Reseptor glukokortikoid (GRL)	obesiti, kerintangan insulin, hipertensi
Faktor Nekrosis Tumor (TNF- α)	kerintangan insulin, peningkatan peratus lemak tubuh, obesiti secara morbid, peningkatan aras leptin, peningkatan aras gula puasa

Adaptasi daripada Groop, (2000).

1.1.2 (b) Faktor genetik dalam diabetes melitus lain

Diabetes jenis 1 (DM1) merupakan jenis diabetes yang lebih berbahaya berbanding DM2 disebabkan pesakit DM1 yang sering mengalami ketoasidosis. Pesakit biasanya terdiri daripada kanak-kanak dan didapati sebanyak 95% daripada pesakit DM1 didiagnos dengan penyakit ini sebelum mencecah umur 25 tahun (<http://www.aaf.org/afp/981015ap/mayfield.html>). Populasi yang mempunyai DM1 merangkumi kurang daripada 10% daripada keseluruhan kes diabetes di seluruh dunia (Noble *et al.*, 1996). Etiologi utama bagi penyakit ini adalah autoimun yang mana terdapat serum antibodi yang tinggi terhadap insulin, sel beta pankreas atau reseptor insulin (Tisch & McDevitt, 1996). Akibatnya pesakit gagal merembeskan insulin dan memerlukan rawatan insulin bagi membantu metabolisme glukosa.

DM1 juga mempunyai kaitan yang kuat dengan HLA dan gen DR atau gen DQ (Gloyn, 2001). Namun faktor genetik tidak memainkan peranan yang begitu penting dalam DM1 yang mana melibatkan hanya 20% daripada hubungan dengan saudara tahap pertama (*first degree relation*). Fungsi gen DR dan DQ ini adalah berbeza kerana sebahagiannya memberi kesan menerukkan diabetes dan sebahagiannya bersifat melindungi (http://www.genetichhealth.com/DBTS_Genetics_of_Type_1_Diabetes.shtml). Daripada keseluruhan kes DM1, 95% daripada pesakit mengekspresi DR3 dan DR4 atau heterozigus DR3/DR4. Jadual 1.2 menunjukkan gen yang terlibat dalam DM1 serta fungsi yang dimainkan dalam populasi tertentu.

Jadual 1.2 Gen yang menyebabkan DM1 dan kesan mutasi terhadap populasi tertentu.

Mutasi gen	Kesan mutasi
HLA-DR1	Kesan mutasi yang lemah
HLA-DR2	Bersifat pelindung terhadap diabetes
HLA-DR3	Kesan diabetes yang signifikan
HLA-DR4	Kesan diabetes yang signifikan
HLA-DR5	Kesan mutasi yang lemah
HLA-DR6	Bersifat pelindung terhadap diabetes atau neutral
HLA-DR7	Bersifat pelindung terhadap diabetes dalam populasi keturunan Afrika
HLA-DR8	Bersifat pelindung terhadap diabetes atau neutral
HLA-DR9	Risiko tinggi bagi populasi China, Japan dan Korea

Adaptasi daripada

http://www.genetichealth.com/DBTS_genetics_of_type_1_Diabetes.shtml.

Faktor persekitaran juga memainkan peranan yang besar dalam perkembangan penyakit ini. Dipercayai faktor persekitaran seperti mempunyai persekitaran intrauterin yang terdedah kepada tahap glukos yang tinggi yang didapati daripada ibu yang mendapat diabetes gestasi (*gestational diabetes*), infeksi virus serta pendedahan awal bayi baru lahir terhadap diet susu lembu. Selain itu toksin nitrosamin dan pendedahan terhadap vaksin akan meningkatkan risiko terhadap individu yang telah mempunyai mutasi gen penyebab DM1. Faktor lain yang juga memainkan peranan dalam perkembangan penyakit ini adalah sejarah keluarga terhadap diabetes serta penyakit lain seperti jangkitan virus coxakie (Tuomilehto *et al.*, 1997).

Maturity onset diabetes of the young (MODY) pula merupakan diabetes yang disebabkan oleh mutasi gen yang bertindak mengikut corak pewarisan Mendelian autosom dominan (Luo *et al.*, 2001). MODY adalah diabetes dalam kelas DM2, namun tindakannya bersifat monogen, manakala DM2 diekspresi hasil tindakan beberapa mutasi gen. Pesakit biasanya berumur di antara 20-40 tahun dan risiko mendapat MODY di kalangan lelaki dan perempuan adalah sama (Luo *et al.*, 2001).

Gen yang biasanya dikaitkan dengan MODY adalah HNF1- α , HNF4- α , glukokinase, IDX-1 serta HNF-1 β seperti yang dilaporkan Habener & Stoffers (1998). Didapati gen HNF4- α berperanan dalam MODY 1, gen glukokinase dalam MODY 2, gen HNF1- α dalam MODY 3, gen insulin promoter factor-1 dalam MODY 4 dan gen HNF-1 β dalam MODY 5 (Luo *et al.*, 2001). Kebanyakan pesakit MODY di negara-negara Asia tergolong dalam kumpulan umur 31 ke 40 tahun, dengan 47% di kalangan pesakit mempunyai lebih berat badan dan 10% mempunyai jasad keton dan mempunyai penanda autoimun (Pan *et al.*, 2004).

Manakala diabetes pewarisan maternal pula adalah diabetes yang disebabkan mutasi titik yang berlaku pada DNA mitokondria (Aggarwal *et al.*, 2001). Mutasi gen yang berlaku adalah pada kedudukan nukleotid 3243 yang menyebabkan penukaran bes adenin kepada guanin pada gen leusin tRNA. Mutasi ini bukan sahaja boleh menyebabkan diabetes tetapi juga kepekakan di kalangan bayi yang baru dilahirkan (Alcolado , Thomas 1995). Genom DNA mempunyai sifat yang amat rapuh dan mudah rosak akibat pendedahan terhadap radikal bebas. Ini kerana sistem pembaikan DNA mitokondria adalah amat terhad dan ketiadaan tulang belakang histon pada struktur DNA menambah keterukan keadaan ini (Gerbitz *et al.*, 1996). Penghasilan diabetes bergantung pada kedudukan tisu di mana kerosakan mitokondria berlaku seperti di tisu periferi dan sel β -pankreas (So *et al.*, 2000). Penyakit diwariskan hanya daripada ibu kepada anak lelaki dan perempuan.

1.1.3 Gen yang terlibat dalam kajian

Dalam kajian ini penumpuan diberikan terhadap empat gen yang telah dikenalpasti terlibat samada dalam perkembangan DM2, obesiti dan/atau kerintangan insulin. Gen-gen tersebut adalah **gen reseptor leptin** (Cioffi *et al.*, 1996), **gen reseptor β_3 -adrenergik** (Elisabeth *et al.*, 1995), **gen reseptor glukokortikoid** (Kopper *et al.*, 1997) **dan gen faktor nekrosis tumor- α** (Fernandez-Real, *et al.*, 1997).

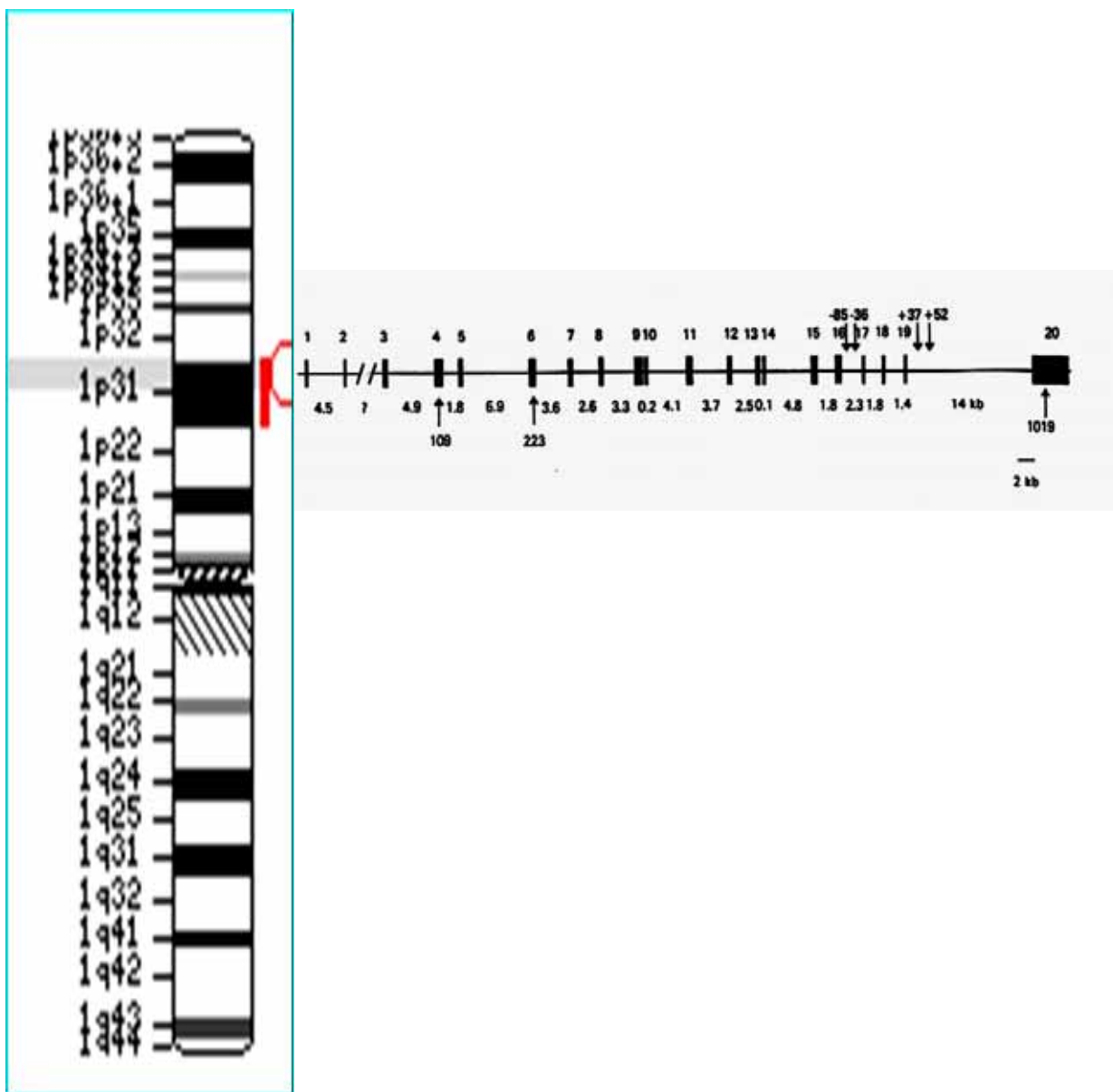
1.1.3 (a) Gen reseptor Leptin

Reseptor leptin (LEPR) merupakan ahli keluarga reseptor sitokin kelas I dan ia dikodkan oleh gen LEPR yang terletak di kawasan 1p31 yang terletak di antara penanda

mikrosatelit D1S515 dan D1S198 (Thompson *et al.*, 1997). Ia ditemui oleh Tartaglia dan rakan-rakan pada tahun 1995. Struktur genom gen ini menjangkau ~70kbp (pasangan bes) dan mempunyai 20 exon (Thompson *et al.*, 1997). Rajah 1.2 menunjukkan kedudukan gen LEPR pada kromosom 1 serta struktur gen LEPR. Gen LEPR terletak di lengan pendek kromosom 1 pada lokus 31.

Fungsi gen LEPR adalah untuk mengkodkan protein reseptor leptin yang bertindak untuk bergabung dengan hormon leptin supaya leptin dapat menjalankan fungsinya secara normal (Tartaglia *et al.*, 1995). Kegagalan gabungan reseptor leptin dan hormon leptin akan menurunkan kadar tindak balas leptin dalam tubuh. Hormon leptin mula ditemui pada tahun 1994 oleh Zhang dan rakan-rakan dan bermula daripada tarikh tersebut terdapat banyak kajian dilakukan bagi menunjukkan kepentingan hormon ini terutamanya dalam insiden obesiti dan DM2 (Pelleymounter *et al.*, 1995 & Sivitz *et al.*, 1997). Leptin berfungsi sebagai adipostat yang akan memberi isyarat pada tubuh mengenai status simpanan tenaga dalam tisu adipos melalui reseptor leptin (Uragoda, 2001).

Leptin merupakan hormon yang dihasilkan daripada tisu adipos terutamanya oleh tisu lemak putih dalam tubuh (Auwerx & Staels, 1998). Ia mempunyai fungsi yang pelbagai dan yang paling utama adalah dalam pengawalan berat tubuh, kelancaran fungsi neuroendokrin dan pengawalaturan pengambilan dan penggunaan tenaga (Houseknetcht *et al.*, 1998). Selain itu leptin bertindak dalam kematangan seksual individu dan merangsang sekresi hormon tirotrofin dan hormon petumbuhan (Clement *et al.*, 1998). Kajian pada tikus mendapati bahawa rawatan dengan leptin mampu meningkatkan metabolisme glukos secara akut (Kamohara *et al.*, 1997)



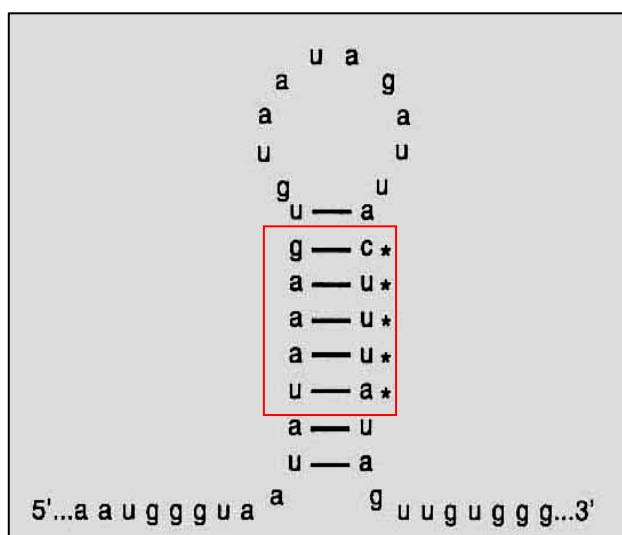
Rajah 1.2 Struktur kromosom 1 yang menunjukkan kedudukan gen LEPR pada kromosom 1p31. Struktur gen LEPR yang ditunjukkan di sebelah kanan menunjukkan terdapatnya 20 ekson dalam gen LEPR. Adaptasi daripada Kontula *et al.*, 1998.

Gen LEPR mempunyai hubungan yang rapat dengan sekresi hormon insulin kerana kedudukannya yang berhampiran dengan penanda mikrosatelit D1S198 (Thompson *et al.*, 1997). Reseptor leptin diekspresi pada pelbagai tisu seperti otak (Considine *et al.*, 1996), sel β -pankreas (Kieffer *et al.*, 1996), hepar (Ghilardi *et al.*, 1996), otot rangka (Wauters *et al.*, 2000), sel ovari (Karlsson *et al.*, 1997) dan sel stem haematopoetik (Cioffi *et al.*, 1996). Dalam sel β -pankreas, LEPR bertindak sebagai perantara dalam perencatan insulin akibat peningkatan aras leptin dalam darah. Terdapat sembilan jenis polimorfisma yang sering berlaku di bahagian ekson dan intron dalam gen LEPR seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 1.3. Lima tapak panas terdapat dalam kawasan mengkod (*coding region*) dan 4 tapak panas terdapat dalam kawasan tak-mengkod (*non-coding region*) (Oksanen *et al.*, 1998). Mutasi-mutasi ini akan menurunkan respon insulin secara akut dan menyebabkan penurunan sensitiviti insulin dan akhirnya menjadi penyebab DM2.

Dalam kajian ini, penumpuan diberikan hanya kepada satu tapak panas bagi gen LEPR iaitu pada kawasan 3'-tak terjemah (*3'-untranslated region*, 3'-UTR) yang melibatkan polimorfisma penyelitan/delesi pentanukleotida dalam struktur gen reseptor leptin. Ini akan menyebabkan berlakunya anjakan rangka bagi jujukan DNA gen LEPR yang memberi kesan kepada struktur mRNA yang dihasilkan selepas proses transkripsi (Oksanen *et al.*, 1998). Penyisipan yang berlaku biasanya melibatkan jujukan CTTTA yang mana akan ditranskripsi kepada GAAAU dalam jujukan mRNA reseptor. Kehadiran jujukan ini menyebabkan terhasilnya struktur batang-gelung (*stem-loop*) yang terbentuk daripada 10 nukleotida bagi struktur gelung dan 8 nukleotida yang berkomplementari bagi struktur batang (Rajah 1.3).

Jadual 1.3 Jenis mutasi yang terdapat dalam gen LEPR.

<i>Bahagian gen</i>	<i>Kedudukan mutasi</i>	<i>Mutasi</i>	<i>Jenis mutasi</i>
Kawasan kodon	Ekson 2	Lys ¹⁹⁰ Arg	mutasi tak bermakna
	Ekson 4	Lys ⁶⁵⁶ Asn	mutasi tak bermakna
	Ekson 13	Leu715	mutasi senyap
	Ekson 14	Gln ²²³ Arg	mutasi tak bermakna
	Ekson 18	Pro1019	mutasi senyap
Kawasan intron	Intron 17	kedudukan ke-20, 31, 37	mutasi senyap
	Kawasan tak terjemah- 3' (3'-UTR)	Penyelitan/delesi pentanukleotida	anjakan rangka

**Rajah 1.3** Struktur batang-gelung yang terbentuk akibat penyelitan GAAAU yang berkompementari dengan CUUUA (ditandakan dengan bintang) dalam jujukan mRNA reseptor leptin. Dipetik daripada Oksanen *et al.*, (2000).

Struktur ini juga pernah diperhatikan wujud dalam mRNA lain seperti histon, reseptor transferin, faktor pertumbuhan seperti-insulin II serta sitokin-sitokin (Ross, 1995). Struktur ini dipercayai mempunyai afiniti yang tinggi untuk bergabung dengan protein regulator yang akan mengganggu kadar degradasi dan/atau translasi mRNA ini (Brown *et al.*, 1996).

Struktur batang-gelung yang terdiri daripada beberapa salinan jujukan yang kaya bes A-U, membentuk elemen pentakstabilan A+U (elemen AUDE) yang bertindak mengganggu kestabilan struktur mRNA pelbagai protein (Ross, 1995). Kedua-dua faktor (struktur batang-gelung dan elemen AUDE) inilah yang akan menyebabkan kecacatan fungsi reseptor leptin dan ini menjadi penyebab hiperinsulinemia. Seterusnya kerintangan insulin berlaku dan menjadi penyebab terhadap insiden DM2.

1.1.3 (b) Gen reseptor β_3 -adrenergik

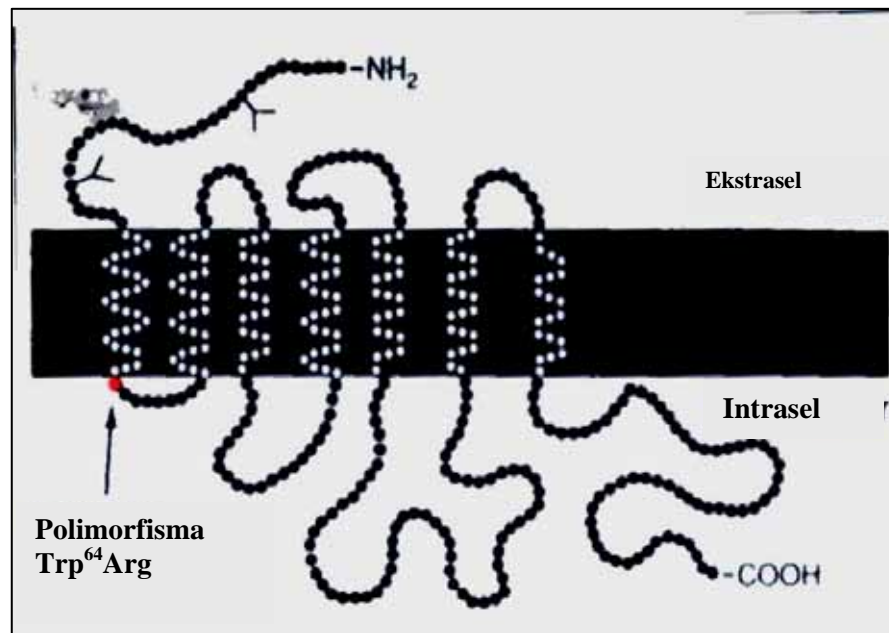
Gen reseptor β_3 -adrenergik (β_3 -AR) juga adalah gen yang pernah dilaporkan berkaitan dengan kejadian DM2. Ia terletak pada kromosom 8p11.2 - p12 dan bersaiz ~8kbp (Emorin *et al.*, 1989). Gen β_3 -AR mempunyai 2 ekson yang berfungsi mengkodkan protein reseptor β_3 -adrenergik. β_3 -AR diekspresi dalam tisu adipos di tisu visera (Emorin *et al.*, 1989). Secara fisiologi, β_3 -AR bertindakbalas memperantara lipolisis melalui ransangan katekolamin, meningkatkan pengangkutan asid lemak bebas ke vena portal dan secara langsung bertindak mengawalatur penggunaan tenaga dan berat tubuh seseorang (Motoyama *et al.*, 1997).

Mutasi pada gen β_3 -AR akan menyebabkan sindrom kerintangan insulin (Kawamura *et al.*, 1997) dan obesiti (Higashi *et al.*, 1997) serta penyakit jantung koronari yang mana merupakan perangsang utama DM2 (Motoyama *et al.*, 1997). Hal ini berlaku kerana apabila tubuh secara kronik telah menghadapi kemasukan lemak yang banyak dalam otot, maka banyak asid lemak bebas tersedia bagi sintesis VLDL dalam hati. Maka komposisi lemak di membran otot-rangka berubah dan meningkatkan kepekatan trigliserid dalam otot.

Bagi mengawal keadaan ini, tubuh akan mengurangkan serapan asid lemak bebas secara meningkatkan keresistanan insulin dalam otot rangka. Mutasi yang paling kerap dikenalpasti pada gen β_3 -AR adalah Trp⁶⁴Arg. Mutasi lain yang pernah dilaporkan adalah G¹⁸⁵⁶T (kawasan intron) dan G³¹³⁹C (kawasan berdekatan dengan 3'-UTR), namun ianya jarang dilaporkan (Azuma *et al.*, 1998). Dalam penyelidikan ini

polimorfisma yang dikaji adalah polimorfisma Trp⁶⁴Arg yang mana berlaku penggantian bes guanin oleh sitosin yang menyebabkan perubahan asid amino triptofan (Trp) kepada arginin (Arg). Perubahan ini berlaku pada gelung pertama reseptor ini (Rajah 1.4).

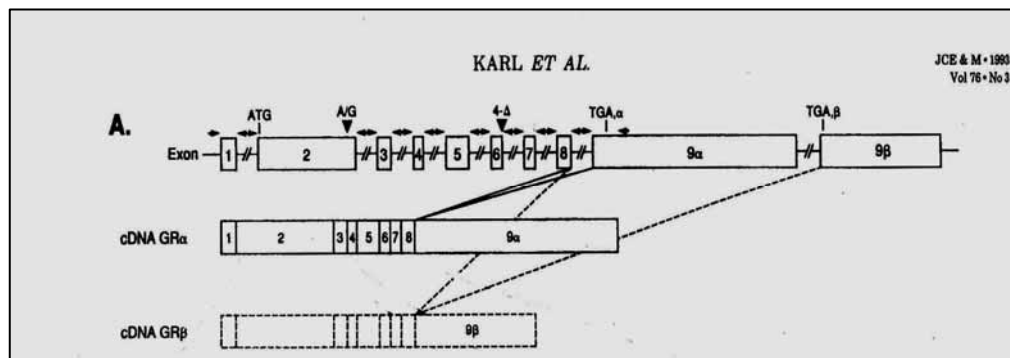
Struktur protein β_3 -AR melalui membran sel sebanyak tujuh kali menghasilkan bahagian intrasel dan esktrasel. Terdapat tiga gelung pada bahagian intrasel dan tiga gelung pada bahagian esktrasel. Dipercayai bahagian gelung pertama intrasel memainkan peranan yang amat penting dalam pergerakan reseptor serta memastikan fungsi normal reseptor β_3 -AR (Ostrowski, 1992). Kewujudan arginin dalam struktur polipeptida reseptor β_3 -AR akan menyebabkan reseptor β_3 -AR tidak dapat bergerak ke permukaan sel dan menghalang gabungan β_3 -AR-reseptor β_3 -AR berganding dengan sistem efektor intrasel (Walston *et al.*, 1995). Ini akan menyebabkan β_3 -AR tidak dapat menjalankan fungsinya dalam metabolisme tubuh.



Rajah 1.4 Struktur ekstrasel dan intrasel reseptor β_3 -adrenergik. Setiap asid amino ditunjukkan dengan bulatan-bulatan kecil. Polimorfisma Trp⁶⁴Arg (yang ditandakan) terletak dalam permulaan gelung pertama bahagian intrasel reseptor. Adaptasi daripada Walston *et al.*, (1995).

1.1.3 (c) Gen reseptor glukokortikoid

Gen reseptor glukokortikoid (GRL) terletak pada kromosom 5q31 – q32, bersaiz 4.1 kbp dan mempunyai 9 ekson (Francke and Foellmer, 1989) (Rajah 1.5). Fungsi gen GRL ini adalah untuk mengkodkan protein reseptor glukokortikoid. Terdapat dua jenis reseptor glukokortikoid iaitu reseptor glukokortikoid- α dan reseptor glukokortikoid- β . Variasi reseptor ini terletak pada ekson ke sembilan gen GRL (Karl *et al.*, 1993).



Rajah 1.5 Struktur gen reseptor glukokortikoid. Gen ini mengandungi sembilan ekson yang mana terdapat *isoform* pada ekson ke-9. Adaptasi daripada Karl *et al.*, (1993).